Ann. agron., 1962, **13** (1), 55-63.

631. 423. 4

UNE MÉTHODE DE FRACTIONNEMENT DENSIMÉTRIQUE PAR CENTRIFUGATION DES MATIÈRES ORGANIQUES DU SOL

G. MONNIER, L. TURC et Colette JEANSON-LUUSINANG

Avec la collaboration technique de Cl. JEANDET

Laboratoire des Sols, Laboratoire d'Étude des Techniques culturales, Centre national de Recherches agronomiques, Versailles (Seine-et-Oise)

SOMMAIRE

Une méthode de fractionnement densimétrique, par centrifugation, des matières organiques du sol est décrite. Les résultats, comparés à ceux de fractionnements densimétriques par simple décantation, font apparaître une simplification et une plus grande vitesse de réalisation. La qualité de la séparation devient tout à fait satisfaisante.

Rappelons qu'il existe dans le sol deux formes très distinctes de matières organiques, bien que soient toujours présents quelques constituants de caractères intermédiaires : la première, plus ou moins grossière, a pour caractéristiques d'être constituée par des débris végétaux, en début d'évolution, non encore fixés à la fraction minérale du sol ; la deuxième est au contraire diffuse, intimement liée à la masse des constituants minéraux ; elle est composée en grande partie de corps évolués de C/N voisin ou inférieur à 10 et qui, contrairement aux premiers, de C/N beaucoup plus élevé, sont peu susceptibles d'une évolution fermentative rapide. Alors que le premier type comprend les matières organiques d'apport récent, ou qui, pour des raisons rattachées soit à leur nature soit aux conditions de milieu, ont peu subi les processus d'humification, le deuxième est essentiellement composé par ce que l'on désigne plus particulièrement par le vocable « d'humus ». Seule, évidemment, cette fraction est à même d'avoir une influence directe sur les propriétés physico-chimiques du sol.

Ces quelques considérations soulignent l'intérêt qu'il y a à séparer avant dosage ces deux fractions.

Différents auteurs ont proposé des méthodes de fractionnement densimétriques

qui reposent sur le principe suivant : la densité de la matière organique libre, voisine de 1, est plus faible que celle du complexe organominéral. L'échantillon est fractionné dans un liquide de densité convenable. Après séparation, chaque fraction est étudiée à part. LEIN (1940) utilisait déjà des mélanges de liquides organiques. HENIN et TURC (1949) ont présenté une technique de séparation dans des béchers, avec des mélanges de benzène et de bromoforme. La technique de séparation proposée par ces auteurs permet dans la plupart des cas de se faire une idée assez précise de l'état des matières organiques dans l'échantillon étudié. Elle présente cependant deux types d'inconvénients. Les premiers sont d'ordre technique : malgré une amélioration due à C. JEANSON-LUUSINANG (1960) la technique se prête mal au travail en série ; elle est délicate et demande un certain tour de main ; par ailleurs, l'amélioration citée nécessite l'utilisation d'un matériel spécial (entonnoirs à décantation de caractéristiques bien déterminées). D'autre part, la séparation devient insuffisante pour les échantillons contenant des matières organiques fines, petites radicelles de plantes de prairie par exemple, qui restent accrochées à la fraction dense du sol.

Dans le but de remédier à ces inconvénients, nous avons repris et mis au point une technique de séparation par densité par centrifugation déjà utilisée par LEIN et qui nous paraissait pourvoir parfaire la séparation et permettre un travail en série dans du matériel standard.

I. — DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE PROPOSÉE

L'échantillon constitué à partir de terre séchée à l'air et tamisée à 2 mm, est de 5 ou 10 g suivant la teneur supposée en matières organiques libres. Il peut être commode, en effet, de traiter une prise de terre telle que la fraction peu dense obtenue puisse constituer la totalité de la prise d'essai pour le dosage ultérieur du carbone qu'elle contient (soit 150 mg environ de fraction peu dense pour une oxydation par du bichromate à 8 %). Cependant, on doit signaler que des séparations de fractions peu denses de 1 500 mg ont pu être réalisées dans des conditions normales avec le matériel utilisé (pots de centrifugeuses de 100 cc et de 25 mm de diamètre). Dans tous les cas, la prise doit être représentative de l'échantillon.

1° *Destruction des agrégats.*

Cette opération a pour but de libérer des matières organiques libres emprisonnées mécaniquement dans les agglomérats. Elle peut être effectuée, soit en détruisant la structure par ébullition dans l'eau, suivie d'un séchage à l'étuve sous l'alcool pour éviter la réapparition d'une cohésion, soit par broyage et tamisage à 500 µ de l'échantillon sec. En fait, lorsqu'on opère par centrifugation, la deuxième technique donne d'aussi bons résultats ; elle est beaucoup plus rapide et ne risque pas de provoquer des redistributions de substances solubles ou pseudo-solubles.

2° *Fractionnement.*

L'échantillon est placé dans un tube de centrifugeuse de 100 cc qui est ensuite rempli avec le liquide densimétrique choisi. On agite avec une baguette de verre et on centrifuge pendant 5 minutes à une vitesse telle que l'accélération au centre du tube soit de l'ordre de 1 000 g [1]. L'arrêt de la centrifugation doit s'effectuer sans l'aide d'un dispositif de freinage dont l'usage risquerait de provoquer une remise en suspension partielle du culot constitué par la fraction la plus dense. Le surnageant est recueilli sur un filtre plat. Le tube est alors empli de nouveau de liquide densimétrique, le culot remis en suspension et recentrifugé 5 minutes à la même vitesse de façon à séparer les matières organiques libres qui auraient pu rester emprisonnées lors de la première centrifugation. Ce surnageant est recueilli sur le même filtre plat que le premier ; les parois du tube sont rincées à l'aide d'un jet du liquide densimétrique en prenant soin de ne pas détacher du culot des parti-

[1] g = accélération de la pesanteur.

TABLEAU I

Comparaison des méthodes par entonnoir et par centrifugation et étude de la reproductibilité de ces méthodes (n° 1 et 2 pour chaque échantillon).

Fractions de densité inférieure à 2 (Fl)

Méthode		Entonnoir				Centrifugation				Comparaison des 2 méthodes (*a*)		
Désignation des échantillons (Prise d'essai 10 g)		Fl mg (1)	C mg (2) dans 1 g de Fl	C/N (3)	C mg (de Fl) dans 1 g de terre totale (4)	Fl mg (5)	C mg dans 1 g de Fl (6)	C/N (7)	C mg (de Fl) dans 1 g de terre totale (8)	$\frac{\Delta Fl}{Fl} \times 100$ (9)	$100 \frac{\Delta\ C‰ \text{ de Fl}}{C‰ \text{ de Fl}}$ (10)	$\frac{\Delta C}{C}$ (*b*) (11)
Jeune prairie sur sable fin n° 636.	n° 1	131	196	17,8	2,57	212,5	201	16,8	4,27			
	n° 2	127	202	18,4	2,56	201,5	202	17,3	4,07	+ 60	+ 1,2	+ 62,2
	Erreur relative	3,1 %	3 %	—	0,4 %	5,3 %	0,5 %		4,8 %			
Rendzine blanche n° 650 sur craie.	n° 1	117	241	28,0	2,82	194	228	26,2	4,42			
	n° 2	149	237	27,4	3,53	191,5	228	26,2	4,37	+ 45	— 4,6	+ 37,5
	Erreur relative	24 %	1,6 %	—	22,3 %	1,3 %	0	—	1,3 %			
Vieille prairie sur limon n° 115.	n° 1	268	192	23,2	5,15	336	240	20,7	8,06			
	n° 2	318	169	21,5	5,37	337	240	20,2	8,08	+ 32,2	+ 33,3	+ 53,6
	Erreur relative	17,0 %	12,8 %	—	4 %	0,3 %	0	—	0,3 %			
Pédologie expérimentale 1958	n° 1	282	168	28,2	4,74	332	214	27,5	7,10			
	n° 2	243	196	31,0	4,76	338	211	27,6	7,13	+ 28,3	+ 16,6	+ 50
	Erreur relative	14,8 %	15,2 %	—	0,4 %	1,8 %	1,8 %	—	0,5 %			

(*a*) Variation relative des résultats obtenus par centrifugation, la méthode à l'entonnoir servant de base de référence.
(*b*) Variation relative du carbone non lié rapporté à la terre totale.

cules de la fraction dense. Avec le mélange alcool-bromoforme que nous avons utilisé, les culots ont toujours, semble-t-il, une cohésion suffisante pour rendre faciles et rapides ces manipulations et pour éviter tout mélange des fractions.

Dans le cas de terres contenant une masse importante de matières organiques libres, les risques d'emprisonnement de particules plus denses que le liquide au sein de cette fraction sont parfois tels qu'il est recommandable de recentrifuger le premier surnageant. Celui-ci est alors recueilli non sur un filtre plat, mais dans un tube de centrifugation et recentrifugé 5 minutes dans le liquide densimétrique.

En fait, les termes correctifs obtenus par recentrifugation des fractions sont très faibles et même fréquemment négligeables.

Les filtres contenant les fractions peu denses et les tubes contenant les fractions denses sont séchés à l'étuve à 105°C.

Lorsqu'on désire un séchage rapide ou lorsque des études chimiques des fractions nécessitent un séchage à plus basse température il est possible d'éliminer le bromoforme par un lavage des fractions à l'alcool, avant leur mise à l'étuve.

Les fractions séchées jusqu'à poids constant sont pesées. Leur teneur en carbone est évaluée par la méthode de ANNE ; l'azote (organique + ammoniacal) est dosé sur une aliquote de la même attaque sulfochromique que le carbone. L'azote ainsi minéralisé, bien qu'en légèrement plus faible quantité que par une attaque Kjeldhal permet de comparer avec le minimum d'erreur les rapports C /N des fractions.

3° *Liquides densimétriques.*

La densité qui permet le plus couramment de séparer dans les meilleures conditions les deux formes « libres » et « liées » est la densité 2. On peut avoir des résultats plus complets en faisant plus de 2 fractions, en utilisant successivement des liquides à densité 1,75 – 2 – 2,25. Dans ce cas, là, on aura évidemment soin de faire sécher l'échantillon entre deux fractionnements de façon à éviter de modifier la densité du liquide utilisé en deuxième et troisième lieux.

Les liquides densimétriques sont obtenus en mélangeant du bromoforme (la qualité dite « pur » à 0,5 % d'alcool convient) avec soit du benzène, soit du tétrachlorure de carbone, soit de l'alcool éthylique celui-ci étant recommandable en raison de sa faible toxicité pour le manipulateur. Après filtration, le liquide peut servir à nouveau, non sans que l'on ait vérifié et éventuellement réajusté sa densité (notons que la centrifugation, même en tube non bouché, ne modifie pas la densité du liquide). De temps en temps, il faut le distiller pour éliminer les traces de corps organiques non volatils qu'il a pu dissoudre et qui risqueraient de fausser les résultats de certaines analyses chimiques obtenus sur des fractions séparées ultérieurement dans ce liquide.

II. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

Nous les présenterons en comparaison avec ceux obtenus sur les mêmes échantillons par la méthode des entonnoirs à décantation de C. JEANSON-LUUSINANG prise comme référence.

Les tableaux 1 et 2 rassemblent les données fournies par les deux techniques appliquées comparativement à 4 échantillons de sols.

TABLEAU 2

Comparaison des méthodes par entonnoir et par centrifugation.
Fractions de densité supérieure à 2 (F_d)

Méthode	Entonnoir (1)		Centrifugation (1)	
Désignation des échantillons	C °/₀₀ de F_d (2)	C/N	C °/₀₀ de F_d (2)	C/N
Vieille prairie sur limon n° 11 ...	18,7	10,4	16,05 (1)	9,8
Pédologie expérimentale 1958 (H. B. + luzerne)......	19,6	10,2	17,7 (1)	9,85

(1) moyenne de deux essais.
(2) teneur en carbone de la fraction dense.

a) *Reproductibilité interne par les deux méthodes*

Par les 2 méthodes la reproductibilité interne des résultats obtenus sur le taux de carbone de la fraction légère rapporté à la terre totale (4) est en général très satisfaisante. Il convient toutefois de noter une différence :

Par la méthode des entonnoirs à décantation la faiblesse de l'erreur sur (4) est due à une compensation des erreurs sur (1) et sur (2). Concrètement cela traduit le fait que, par cette méthode, les fractions légères sont fréquemment souillées par des particules minérales restées accrochées sur les parois de l'entonnoir. C'est cette surcharge de Fl qui entraîne en compensation un abaissement du taux de carbone de la fraction. Ceci est particulièrement visible sur l'échantillon « Pédologie expérimentale 1958 » (tableau 1). Au contraire, par centrifugation, ce sont des erreurs faibles à la fois sur (5) et (6) qui font que l'erreur sur (8) est très réduite. Il devient alors possible d'utiliser, pour certaines recherches, ces deux données directes du fractionnement, et non plus seulement leur produit.

b) *Comparaison des deux méthodes*

Par centrifugation, la masse des fractions peu denses extraites des 4 terres étudiées est augmentée de 30 à 60 % ; la teneur en carbone de ces fractions demeure pratiquement inchangée dans deux cas, croît de 15 à 30 % dans les deux autres. Rapporté à la terre totale, le taux de carbone présent dans le sol sous forme libre apparaît comme plus élevé de 40 à 60 %, Parallèlement, le C/N de la fraction légère est plus élevé de 5 % environ par la méthode à l'entonnoir, probablement parce que seules les matières organiques les plus grossières, pour lesquelles le contact avec la partie minérale est le plus faible, sont séparées.

Sur le tableau 2, on peut constater que, mieux débarassée des matières libres à C/N élevé, la fraction dense obtenue par centrifugation présente un taux de carbone et un rapport C/N légèrement plus faibles.

Cette augmentation considérable de la masse peu dense extraite nous a conduit à essayer d'extraire par centrifugation pour la caractériser la partie de la fraction libre qui n'avait pu être séparée de la fraction dense par la méthode à l'entonnoir. Les résultats sont consignés dans le tableau 3.

Pour faciliter la lecture de ce tableau 3 nous prendrons un exemple : « Pédologie Expérimentale 1958 » n° 1.

Par la méthode à l'entonnoir, on a pu extraire de 10 g de cet échantillon 282 mg de fraction peu dense (1) présentant une teneur en carbone de 168 p. 1 000 (2) soit, rapporté à l'échantillon total un taux de carbone « non lié » de 4,74 p. 100 (4). La centrifugation directe sur cet échantillon permet, elle, d'extraire 338 mg de Fl pour 10 g de sol (9) représentant 7,10 p. 1 000 de carbone « non lié » rapporté à la terre totale (10). La centrifugation de la fraction dense obtenue par la première méthode permet de récupérer une fraction peu dense de 102 mg (5). Cette fraction présente une teneur en carbone élevée de 204 p. 1 000 (b) et un rapport C/N élevé : 24,9 (7). Il s'agit donc bien d'un matériau comparable à celui extrait par décantation. Ce fait est d'ailleurs confirmé par l'observation directe à la loupe binoculaire. Enfin on constate que la somme (1) + (5) = 6,82 p. 1 000, des quantités de carbone respectivement contenues dans la fraction séparée par décantation et dans celle récu-

TABLEAU 3

Essai de récupération par centrifugation de la partie de fraction légère restée emprisonnée dans la fraction dense obtenue par la méthode à l'entonnoir

Opérations		Fractionnement sur entonnoir				Centrifugation de la fraction dense « Entonnoir »				Somme des fractions légères		Centrifugation directe de l'échantillon initial		
Désignation des échantillons (prise d'essai 10 g)		Fl mg (1)	C mg dans 1 g de Fl (2)	C/N (3)	C mg (de Fl) dans 1 g de terre totale (4)	Fl mg (5)	C mg dans 1 g de Fl (6)	C/N (7)	C mg (de Fl) dans 1 g de terre totale (8)	(1) + (5)	(4) + (8)	Fl mg (9)	C mg (de Fl) dans 1 g de terre totale (10)	C/N (11)
Vieille prairie de Bernay sur limon nº 115.	nº 1	268	192	23,2	5,15	110	193	16,4	2,12	378	7,27	336	8,06	20,7
	nº 2	318	169	21,5	5,37	108	193	16,4	2,08	426	7,45	337	8,08	20,2
Pédologie expérimentale 1958.	nº 1	282	168	28,2	4,74	102	204	24,9	2,08	384	6,82	338	7,10	27,6
	nº 2	243	196	31,0	4,76	96			1,96	339	6,72	332	7,13	27,5

pérée ensuite par centrifugation de la fraction dense ainsi obtenue, et rapportées à la terre totale est très voisine de la teneur en carbone « non lié » de la terre totale (10) traitée directement par centrifugation : 7,1 %.

Pour tester en valeur absolue la technique proposée, nous avons fabriqué deux échantillons artificiels en ajoutant au cours d'un malaxage sous l'eau à de la terre ne contenant pratiquement pas de matières organiques libres (horizon B du sol de limon de Versailles) 10 % de farine de paille d'avoine de granulométrie inférieure à 200 µ ou comprise entre 200 µ et 2 mm. La pâte soigneusement homogénéisée a été ressuyée sur Buchner et séchée à l'étuve. Dans les deux cas l'addition de matière organique libre correspondait à 47,5 p. 1 000 de carbone.

Aux deux échantillons obtenus enrichis en farine de paille d'avoine très fine pour l'un, plus grossière pour l'autre, on a appliqué les deux techniques (entonnoir et centrifugation).

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 4.

TABLEAU 4

Séparation par densité d'échantillons enrichis en matières organiques libres fines ou grossières
Le carbone contenu dans chaque fraction est rapporté à la terre totale

Échantillon	Méthode	$d < 2$		$d > 2$		Total
		C ‰	C/N	C ‰	C/N	C ‰
Horizon B + 10 % farine de paille d'avoine fine.	Entonnoir	20,9	76,3	27,8	29,7	48,7
	Centrifugation	34,8	71,0	12,3	19,5	47,1
Horizon B + 10 % farine de paille d'avoine grossière.	Entonnoir	43,4	—	8,4	16,4	51,8
	Centrifugation	46,2	—	4,9	11,5	51,1

Il ressort de ces résultats que lorsque la matière organique libre est grossière, l'amélioration due à la centrifugation quoique encore sensible est relativement faible, (de l'ordre de 5 à 10 p.100 sur le carbone p. 1 000 de terre totale), mais alors la quasi-totalité de la fraction libre totale de la matière organique présente est extraite par la technique proposée.

Par contre, lorsque la matière organique libre est sous un état très divisé, le gain par utilisation de la centrifugation est considérable (près de 70 % dans le cas présent, mais aussi 50 à 60 % dans le cas des sols de prairies cités plus haut et très riches en radicelles fines et poils absorbants) bien que cette technique ne parvienne pas à extraire la totalité de la fraction libre présente.

Il faut, toutefois, souligner qu'il s'agit ici d'un cas très particulier et nous avons vu (tableau 1) que l'extraction pouvait être considérée comme suffisante [1] dans le cas des sols normaux puisque le rapport C/N des fractions denses descendait à des valeurs inférieures à 10 alors qu'ici il est encore de 19,5 par suite de la présence de paille d'avoine non extraite.

On notera que le bilan en carbone qui devrait faire apparaître un taux de carbone total de 51,5 p. 1 000, 47,5 p. 1000 provenant de l'addition de paille et 4 p. 1 000

[1] Ce fait est confirmé par l'observation directe des fractions denses à la loupe binoculaire.

provenant de la matière organique initiale de l'horizon B) n'est satisfaisant que dans le cas de l'addition de paille peu divisée. En présence de farine de paille fine, on constate une disparition de carbone. La seule explication vraisemblable est la solubilisation dans le liquide densimétrique de certains constituants des pailles à partir du matériau le plus divisé.

CONCLUSION

L'utilisation de cette technique de fractionnement par centrifugation présente des avantages dans deux ordres d'idée.

1° — Du point de vue technique, l'opération est considérablement simplifiée, et devient beaucoup plus rapide : un opérateur disposant d'une centrifugeuse à 8 pots peut réaliser 8 fractionnements en moins de deux heures et cela en manipulant 4 à 5 fois moins de liquide densimétrique que par la méthode des entonnoirs à décantation. De plus le matériel nécessaire existe dans la plupart des laboratoires d'étude du sol.

2° — Le plus gros progrès réalisé concerne toutefois la qualité du fractionnement.

Pour la plupart des échantillons étudiés, la séparation est tout à fait satisfaisante. Les fractions légères sont plus « spécifiques » que par décantation ce qui permet d'utiliser directement leur poids pour certaines comparaisons. Les fractions denses, elles aussi, sont débarrassées de la presque totalité des particules organiques libres. Leur teneur en carbone peut être interprétée plus facilement et plus sûrement

Seules quelques matières organiques très fines restent, nous l'avons vu, difficiles à séparer, bien que ce soit dans leur cas que l'amélioration due à la centrifugation soit la plus sensible; mais il ne s'agit là que d'échantillons spéciaux et encore faudrait-il savoir si, en deça d'une certaine taille des particules organiques, il ne se crée pas de liaisons plus intimes entre elles et les particules minérales.

Hormis ces cas spéciaux, la technique proposée apparaît simple, d'emploi rapide, fidèle et beaucoup plus efficace, que les techniques utilisées jusqu'ici dans le même but. Elle devrait permettre une généralisation du fractionnement des matières organiques qui est, nous l'avons vu, indispensable pour les études à court terme de bilan organique des sols et pour les recherches concernant les relations entre la matière organique et différentes propriétés physiques ou chimiques du sol.

Reçu pour publication en janvier 1962.

SUMMARY

A METHOD OF DENSIMETRIC FRACTIONATION OF SOIL ORGANIC-MATTER BY CENTRIFUGING

Densimetric fractionation of soil organic-matter permits the separation of « free » organic-matter, consisting of slightly evolved products of high C/N ratios and possessing a lower density, from the organo-mineral complex which contains the greater part of the matter which in general terminology is called « humus ». The fractionation by means of centrifuging liquid organic mixtures is easily and rapidly performed, and the amounts separated are usually very satisfactory.

A general acceptance of such a method would increase the precision of studies on the evolution of organic matter and its role in certain physical properties of soils.

ZUSAMMENFASSUNG

EINE DENSIMETRISCHE FRAKTIONIERUNGSMETHODE DURCH ZENTRIFUGATION DER ORGANISCHEN BODENSUBSTANZ

Die densimetrische Fraktionierung der organischen Bodensubstanz erlaubt es die « freie » organische Substanz, hauptsächlich aus wenig evoluierten Produkten mit hohem C/N verhältnis und niedriger Wichte bestehend, vom organo-mineralischen Komplex mit dem grössten Teil dessen, was man geläufig als « Humus » bezeichnet, zu trennen. Eine solche Fraktionierung ist, wenn sie durch Zentrifugation in Mischungen organischer Flüssigkeiten geschieht, technich sehr leicht und rasch, In den meisten Fällen ist die Qualität der Trennung sehr zufriedenstellend.

Durch Verallgemeinerung einer solchen Methode würden die Untersuchungen über Evoluierung der org. Substanz und deren Rolle in bestimmten physikalischen Eigenschaften der Böden eine grössere Genauigkeit erfahren.

Фракционирование органического вещества почвы удельным весом и при помощи центрифугации.

Г. МОНИЕ, Л. ТЮРК и КОЛЕТТА ЖАНСОН-ЛЮЗИНАНГ.

Фракционирование органического вещества почвы удельным весом позволяет отделить от органическо-минерального комплекса содержащего большую часть того что принято обычно называть « гумусом », некоторые « свободные » органические вещества представляющие из себя плохо эволюционировавшие продукты с высоким соотношением C/N и небольшим удельным весом. Фракционирование это, произведенное при помощи центрифугации несложно в техническом отношении и занимает немного времени. Качество-же разделения — в большинстве случаев весьма удовлетворительно.

Распространение данного метода позволит достичь большей точности при изучениях эволюции органического вещества и его влияния на некоторые физические свойства почв.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LEIN Z. Ja., 1940. Les formes de liaison de l'humus avec la partie minérale des sols. *Potchvovedénie*, **10**.

HENIN S., TURC L., 1949. Essai de fractionnement des matières organiques du sol. *C R. Acad. Agric.*, **35**, 41-43.

JEANSON LUUSINANG C., 1960. Fractionnement par densité de la matière organique des sols. *Ann. agron.*, **11**, 481-496.